

TEKNIK APLIKASI KONSORSIUM BAKTERI ENDOFITIK PENAMBAT N₂ ASAL TUMBUHAN EKOSISTEM AIR HITAM KALIMANTAN TENGAH DALAM MENINGKATKAN PERTUMBUHAN DAN PENAMBATAN N₂ TANAMAN PADI GOGO

Mieke R. Setiawati¹, Tualar Simarmata¹, Yuyun Sumarni¹,
Dedeh H.Arief¹, dan Dwi Andreas Santosa², Hari R. Hariyadi³

¹Lab Biologi dan Bioteknologi Tanah Fakultas Pertanian UNPAD,

²Lab. Mikrobiologi dan Bioteknologi Lingkungan PPLH IPB.

³Lab. Mikrobiologi Lingkungan PP Kimia LIPI

E-mail : miekesetiawati@yahoo.com

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan teknik aplikasi konsorsium bakteri endofitik asal tumbuhan Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah yang dapat meningkatkan pertumbuhan dan penambatan N₂ tanaman padi gogo. Percobaan dilakukan di Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran.

Dari seleksi tahap awal didapatkan 12 konsorsium bakteri endofitik asal tumbuhan Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman padi gogo. Dua dari 12 konsorsium bakteri endofitik tersebut dapat menambat N₂ secara konsisten dan meningkatkan pertumbuhan dan penambatan N₂ pada tanaman padi gogo. Konsorsium tersebut adalah konsorsium H yang diisolasi dari daun tumbuhan Waru (*Dillenia pulchella*) dan konsorsium I yang diisolasi dari tumbuhan Gemor (*Alceodaphne* sp.).

Rancangan penelitian yang digunakan pada percobaan ini adalah Rancangan Acak Lengkap faktorial 3 faktor dengan tiga ulangan. Faktor pertama adalah jenis konsorsium bakteri endofitik penambat N₂ yang terdiri dari dua taraf yaitu : i_1 = konsorsium H dan i_2 = konsorsium I. Faktor kedua adalah cara aplikasi bakteri endofitik penambat N₂ yang terdiri atas dua taraf, yaitu : a_1 = benih direndam dengan suspensi bakteri selama 24 jam dan a_2 = tanaman padi umur 1 MST disemprot dengan suspensi bakteri. Faktor ketiga adalah kepadatan inokulan bakteri endofitik penambat N₂ yang terdiri atas empat taraf, yaitu : p_0 = tanpa

inokulan, p_1 = kepadatan inokulan 10⁷ CFU ml⁻¹, p_2 = kepadatan inokulan 10⁹ CFU ml⁻¹, p_3 = kepadatan inokulan 10¹¹ CFU ml⁻¹. CFU adalah singkatan dari Colony-Forming Unit yang mencerminkan satuan mikroba yang membentuk sebuah koloni.

Hasil percobaan menunjukkan aplikasi konsorsium kedua bakteri endofitik penambat N₂ dengan cara merendam benih padi gogo di dalam suspensi bakteri dengan kepadatan 10¹¹ CFU ml⁻¹ selama 24 jam dapat meningkatkan pertumbuhan dan penambatan N₂ tanaman padi gogo. Berat kering tanaman dan aktivitas nitrogenase tanaman padi gogo yang diinokulasi konsorsium H dan I berturut turut sebesar 0,084 dan 0,097 g serta 254,0 dan 225,0 nmol g⁻¹jam⁻¹.

Anggota konsorsium H bakteri endofitik penambat N₂ adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas vesicularis*, dan *Burkholderia cepacia* sedangkan anggota konsorsium I adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, dan *Acinetobacter baumannii*

Kata Kunci : Bakteri endofitik, Nitrogen, Tumbuhan Ekosistem Air Hitam, Padi Gogo.

ABSTRACT

This study was intended to derive an application technique of bacterial consortium obtained from the plantation black water ecosystem of Central Kalimantan, and therefore to increase the nitrogen

fixation and growth of the upland rice. The experiments were conducted in the Biology and Biotechnology Laboratory, Faculty of Agriculture, Padjadjaran University, Jatinangor-West Java.

The preliminary selection of inoculum source from the plantation ecosystem at black water ecosystem of Central Kalimantan produced 12 consortia of the endophytic bacterium that increase the growth of upland rice. Among of the 12 consortia, 2 consortia (did contribute nitrogen fixation consistently and so increase the growth of upland rice. The two consortia were a bacterial consortium (H) isolated from the leaves of Waru plant (*Dillenia pulchella*) and a bacterial consortium (I) isolated from Gemor plant (*Alceodaphne* sp.).

Three factorial of Complete-Random Design and triplo experiment was selected for the experimental design of this study. First factor was consortium of endophytic nitrogen fixation bacterial with two stages (i_1 = consortium H and i_2 = consortium I). The second factor was the technique of endophytic nitrogen fixation bacteria application with two stages (a_1 = rice seed soaked in the bacterial suspension for 24 hours and a_2 = 1 MST old rice plant sprayed the bacterial suspension). The third factor was turbidity (population) of endophytic nitrogen fixation bacterial inoculum with 4 stages (p_0 = no inoculum control, p_1 = 10^7 CFU.ml⁻¹, p_2 = 10^9 CFU.ml⁻¹, p_3 = 10^{11} CFU.ml⁻¹). The CFU is a Colony-Forming Unit indicating microbes in a form of colony, initially, grew from single cell.

The results of this experiment showed that the application technique of endophytic nitrogen fixation bacteria by soaking the upland rice seed in bacterial suspension containing 10^{11} CFU.ml⁻¹ for 24 hours was able to increase the growth and nitrogen fixation of the upland rice plant. Dry weight of the plant inoculated with consortia H and I was respectively 0.084 and 0.097 g while the nitrogenase activity of the upland rice plant inoculated with consortia H and I was 254.0 and 225.0 nmol g⁻¹ DW hour⁻¹, respectively. With Microbact 24 E (12E/12A + 12B) and API-20 NE methods, member of endophytic nitrogen fixation bacteria from consortium H was indentified as *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas vesicularis*, and

Burkholderia cepacia while from consortium I was *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, and *Acinetobacter baumannii*.

Kata Kunci : Endophytic bacteria. Nitrogen, Plantation black water ecosystem, Upland rice plant.

PENDAHULUAN

Tumbuhan yang terdapat pada Ekosistem Air Hitam Kabupaten Barito Selatan, Kalimantan Tengah umumnya merupakan tanaman pionir yang mampu hidup dalam kondisi ekstrim. Tanaman endemik yang khas pada lokasi tersebut tentunya berkemampuan lebih dari tanaman lain yang tumbuh pada kondisi normal. Dari tanaman tersebut besar kemungkinan diperoleh mikroba unik yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai pupuk hayati seperti bakteri penambat N₂, pemacu pertumbuhan tanaman, atau mikroba yang berkemampuan berkompetisi dengan penyakit tanaman. Oleh karena itu, pemanfaatan bakteri endofitik penambat N₂ hasil eksplorasi dari Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah merupakan salah satu alternatif yang dapat diaplikasikan sebagai pensubstitusi pupuk nitrogen anorganik.

Pemanfaatan bakteri endofitik penambat N₂ dari hasil eksplorasi ekosistem yang kaya akan keanekaragaman sumber hayatinya merupakan salah satu alternatif dalam menutupi ketimpangan akibat penggunaan pupuk nitrogen anorganik. Nitrogen yang dihasilkan selain dari proses asimilasi biologis dapat memberi dampak pencemaran nitrat pada air tanah dan dari sisa nitrogen yang tidak termanfaatkan akan diubah menjadi gas N₂O yang berpotensi dalam efek rumah kaca. *Stoltzfus et al.*, (1997) menyatakan bahwa *endosymbiotic* penambat N₂ yang berasosiasi dengan tanaman, dapat memberikan nitrogen yang ditambatnya secara biologis langsung pada tanaman.

Sturz dan Nowak (2000) menyatakan bahwa dalam mengeksplorasi mikroba endofitik perlu suatu strategi yang dimulai dari isolasi dan purifikasi mikroba endofitik yang bersifat menguntungkan dari mikroba penyebab penyakit, menguji kemampuannya dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman, memperbanyak, dan mengaplikasikan pada tanaman sedini mungkin agar mendominasi populasi mikroba pada jaringan tanaman yang diinokulasi.

Teknik aplikasi isolat bakteri endofitik penambat N_2 pada tanaman padi gogo dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti halnya pemberian pupuk biologis, aplikasinya dapat dengan perendaman pada benih atau penyemprotan pada tanaman yang muda. Dosis aplikasi yang tepat perlu dicari mengingat banyaknya bakteri endofitik penambat N_2 yang diaplikasikan mempengaruhi kemampuan adaptasi di tempat yang baru.

Inokulasi bakteri endofitik pada jaringan tanaman yang tepat dapat membantu keberhasilan kolonisasi bakteri tersebut. Quadthallmann and Kloepper (1996) telah mencoba menginokulasi bakteri endofitik *Pseudomonas fluorescens* pada jaringan biji, batang, dan daun tanaman kapas. Cara aplikasinya adalah merendam biji kapas dengan suspensi inokulan selama 30 menit, sedangkan pada daun tanaman kapas berumur 2 minggu bakteri endofitik disebarkan dengan pipet secara merata dan pada batang kapas bagian bawah disuntikkan bakteri endofitik sebanyak 20 mL. Bakteri endofitik *P. fluorescens* yang diinokulasi pada biji dan daun dapat diisolasi kembali setelah tanaman diinkubasikan selama dua minggu, tetapi tidak halnya dengan yang diinokulasikan pada batang.

Aplikasi bakteri endofitik penambat N_2 pada benih atau tanaman inang harus memperhatikan kepadatan inokulum bakteri tersebut. Kepadatan bakteri endofitik yang tepat ketika diinokulasikan pada tanaman meningkatkan daya adaptasi pada lingkungan yang baru. Hal itu dijadikan dasar pertimbangan jika bakteri endofitik penambat N_2 akan diaplikasikan di lapangan, sedangkan bakteri

filosfer lainnya telah lebih dahulu menempati jaringan permukaan tanaman. Kepadatan bakteri endofitik yang diberikan pada biji dan daun tanaman kapas sebesar $1,0 \times 10^7$ cfu/mL telah berhasil mengkolonisasi organ tersebut dan berhasil diisolasi kembali dengan kepadatan $1,1 \times 10^3$ sampai $8,7 \times 10^5$ cfu g^{-1} jaringan akar dan lebih kurang $1,6 \times 10^4$ CFU g^{-1} bobot basah daun (Quadthallmann dan Kloepper 1996).

BAHAN DAN METODA

Ekstraksi bakteri endofitik dari jaringan tumbuhan dari ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah dilakukan dengan metode Stoltzfus (1997) yang dimodifikasi. Bakteri endofitik yang diperoleh dari jaringan sampel tanaman berupa konsorsium bakteri endofitik dari ekstrak tanaman dalam larutan bufer fosfat.

Pada seleksi awal 29 konsorsium bakteri endofitik asal vegetasi Kalimantan Tengah diuji kemampuannya dalam mengkolonisasi dan meningkatkan bobot kering serta aktivitas nitrogenase tanaman padi gogo. Konsorsium bakteri endofitik yang diisolasi dalam bentuk ekstrak tumbuhan diinokulasikan pada tanaman padi gogo umur tiga hari dan ditumbuhkan pada medium semi solid Fahraeus di dalam tabung reaksi (Stoltzfus et al., 1997). Dua konsorsium terpilih diisolasi dan diinokulasikan kembali pada tanaman padi gogo umur tiga hari yang ditanam pada media semisolid Fahraeus dalam tabung reaksi dengan dua macam cara aplikasi dan dipelihara selama 21 hari pada growth chamber.

Pengujian teknik aplikasi dan kepadatan dua konsorsium endofitik terpilih terhadap peningkatan bobot kering dan penambatan N_2 tanaman padi gogo dilakukan dengan rancangan acak lengkap pola faktorial ($2 \times 2 \times 4$) dengan tiga ulangan. Tiga faktor yang diteliti adalah:

- (1) faktor pertama, jenis konsorsium bakteri endofitik penambat N_2 yang terdiri atas dua taraf, yaitu:
 - (a) konsorsium ke-1 bakteri endofitik penambat N_2 (i_1),
 - (b) konsorsium ke-2 bakteri endofitik penambat N_2 (i_2).

- (2) faktor kedua, cara aplikasi bakteri endofitik penambat N_2 yang terdiri atas dua taraf, yaitu:
- benih direndam dengan suspensi bakteri selama 24 jam (a_1),
 - tanaman padi umur 1 MST (Minggu Setelah Tanam) disemprot dengan suspensi bakteri (a_2).
- (3) faktor ketiga, kepadatan dalam satuan Colony-Forming Unit per mL ($CFU \cdot mL^{-1}$) inokulan bakteri endofitik penambat N_2 yang terdiri atas empat taraf, yaitu:
- tanpa inokulan (p_0),
 - kepadatan inokulan $10^7 CFU \cdot mL^{-1}$ (p_1),
 - kepadatan inokulan $10^9 CFU \cdot mL^{-1}$ (p_2),
 - kepadatan inokulan $10^{11} CFU \cdot mL^{-1}$ (p_3).

Analisis data dilakukan dengan uji F dan untuk membedakan antara rata-rata perlakuan pada setiap respons, digunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf nyata 0.05.

Anggota kedua konsorsium yang digunakan dalam percobaan diidentifikasi dengan menggunakan Kit Microbact 24 E (12E/12A + 12B) untuk bakteri golongan *Enterobacter*, sedangkan Kit API-20 NE

digunakan untuk mengidentifikasi golongan non *Enterobacter* sehingga anggota dari konsorsium bakteri endofitik penambat N_2 tersebut dapat diketahui.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada tahap seleksi konsorsium bakteri endofitik dilakukan uji konsistensi dari konsorsium bakteri endofitik yang dapat meningkatkan bobot kering dan aktivitas nitrogenase (ARA, Acetylene Reduction Assay) tanaman padi gogo. Dari seleksi tahap awal didapatkan 12 konsorsium bakteri endofitik asal tumbuhan Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman padi gogo. Dua dari 12 konsorsium bakteri endofitik tersebut dapat menambat N_2 secara konsisten dan meningkatkan pertumbuhan dan penambatan N_2 pada tanaman padi gogo. Konsorsium tersebut adalah konsorsium H yang diisolasi dari daun tumbuhan Waru (*Dillenia pulchella*) dan konsorsium I yang diisolasi dari daun tumbuhan Gemor (*Alceodaphne* sp.).

Tabel 1. Aktivitas nitrogenase tanaman padi gogo akibat inokulasi konsorsium bakteri endofitik dengan berbagai kepadatan

Jenis konsorsium (I)	Aplikasi (A)	Kepadatan bakteri endofitik (P)			
		0 (p_0)	10^7 (p_1)	10^9 (p_2)	10^{11} (p_3)
H (i_1)	Direndam (a_1)	41,00 a A	226,50 a B	231,50 a B	254,00 b C
	Disemprot (a_2)	47,00 a A	234,00 ab B	242,00 b B	255,50 b C
I (i_2)	Direndam (a_1)	44,00 a A	231,50 a B	273,50 c C	225,00 a B
	Disemprot (a_2)	43,50 a A	241,00 b C	248,50 b C	255,00 a B

Keterangan : Angka yang ditandai dengan huruf kecil yang sama (vertikal) dan huruf kapital yang sama (horizontal) tidak berbeda nyata menurut Uji BNT pada taraf 5 %.

Konsorsium bakteri endofitik yang disemprotkan pada permukaan daun dan yang diinokulasikan dengan cara perendaman benih akan mengkolonisasi tanaman tersebut dengan cara yang berbeda. Aplikasi konsorsium bakteri endofitik harus sedekat mungkin dengan tanaman yang diinokulasi karena menurut Rolfe dan Weinman (2001) bakteri yang diinokulasikan di suatu tempat ternyata hanya dapat bergerak pada jarak yang tidak lebih dari 2 cm dari lokasi inokulasi. Adaptasi dan ketahanan bakteri endofitik yang diinokulasikan pada tanaman bergantung pada kondisi tanaman itu sendiri. Morris (2001) menyatakan bahwa mikroba berkemampuan untuk hidup dan menyebar bila diaplikasikan pada permukaan daun yang bergantung pada ketersediaan nutrisi daun. Jika

dalam mengkolonisasi permukaan daun kondisinya tidak menguntungkan, koloni bakteri tersebut akan mengatur strategi dan akan membentuk agregat atau mikrokoloni.

Aplikasi bakteri dengan cara merendamkan benih padi gogo di dalam suspensi konsorsium bakteri endofitik menyebabkan konsorsium bakteri dapat masuk kedalam jaringan benih padi dan akan tumbuh di dalam jaringan benih. Fahey et al., (1991) menyatakan bahwa aplikasi bakteri endofitik pada benih jagung sebelum tanam dengan cara merendamnya dalam suspensi bakteri endofitik menyebabkan bakteri tersebut dapat mengkolonisasi dan bertahan serta berkembang di dalam benih. Kolonisasi itu akan dilanjutkan pada saat tanaman tumbuh.

Tabel 2. Bobot Kering tanaman tanaman padi gogo akibat inokulasi konsorsium bakteri endofitik dengan berbagai kepadatan

Jenis Konsorsium (I)	Aplikasi (A)	Kepadatan bakteri endofitik (P)			
		0 (p ₀)	0 ⁶ (p ₁)	10 ⁹ (p ₂)	10 ¹¹ (p ₃)
H (i ₁)	Direndam (a ₁)	----- g -----			
		0,067 a A	0,077 a B	0,089 a C	0,084 a C
	Disemprot (a ₂)	0,078 a A	0,082 a B	0,088 a C	0,080 a B
I (i ₂)	Direndam (a ₁)	0,075 a A	0,089 b B	0,096 b C	0,097 b C
	Disemprot (a ₂)	0,072 a A	0,094 b B	0,090 b C	0,078 a B

Keterangan : Angka yang ditandai dengan huruf kecil yang sama (vertikal) dan huruf kapital yang sama (horizontal) tidak berbeda nyata menurut Uji BNT pada taraf 5 %.

Aktivitas nitrogenase (Tabel 1) dan bobot kering tanaman padi gogo (Tabel 2) meningkat akibat inokulasi konsorsium bakteri endofitik H dan I dengan kepadatan diatas 10^7 CFU mL⁻¹. Konsorsium H meningkatkan secara nyata aktivitas nitrogenase dan bobot kering tanaman padi gogo pada kepadatan 10^{11} CFU mL⁻¹ dengan aplikasi direndam atau disemprot. Pada konsorsium I aplikasi direndam lebih baik dari pada disemprot dengan kepadatan 10^9 CFU mL⁻¹. Peningkatan bobot kering tanaman sejalan dengan peningkatan aktivitas nitrogenase tanaman padi, hanya saja pengaruh kepadatan 10^{11} CFU mL⁻¹ tidak berbeda dengan kepadatan 10^9 CFU mL⁻¹.

Kepadatan konsorsium bakteri endofitik H dan I sebesar 10^{11} CFU mL⁻¹ dengan aplikasi direndam merupakan kepadatan dan cara aplikasi yang dipilih untuk disarankan dalam penerapannya. Kepadatan tertinggi dipilih berdasarkan percobaan pendahuluan (yang tidak disajikan dalam makalah ini) bahwa tidak seluruh bakteri yang digunakan untuk merendam benih akan masuk kedalam benih padi (Setiawati et al., 2003). Menurut Fahey et al., (1991) perendaman benih dengan kepadatan bakteri yang tinggi menyebabkan perbedaan tekanan akibat suspensi bakteri dalam bufer fosfat sehingga bakteri terdorong masuk dalam benih melalui pedisel. Pada saat benih dikeluarkan dari suspensi, bakteri tetap berada dalam embrio.

Dari hasil identifikasi dengan menggunakan kit Microbact 24 E (12E/12A + 12B) untuk bakteri golongan Enterobacter, dan kit API-20 NE untuk golongan non Enterobacter, anggota konsorsium H bakteri endofitik penambat N₂ adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas vesicularis*, dan *Burkholderia cepacia* sedangkan anggota konsorsium I adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, dan *Acinetobacter baumannii*.

KESIMPULAN

- (1) Aplikasi dengan cara merendam benih padi gogo pada inokulan cair dengan kepadatan 10^{11} CFU mL⁻¹ selama 24 jam dapat

meningkatkan pertumbuhan dan penambatan N₂ pada tanaman padi gogo.

- (2) Anggota konsorsium H bakteri endofitik penambat N₂ adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas vesicularis*, dan *Burkholderia cepacia* sedangkan anggota konsorsium I adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, dan *Acinetobacter baumannii*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fahey, J.W., M.B. Dimock, and S.F. Tomasino. 1991. *Genetically engineered endophytes as biocontrol agents : a case study from industry*. In *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York.
2. Morris, C. 2001. *The impact of biofilms on ecology and control of epiphytic bacteria*. *Interdisciplinary plant biology Seminar Speaker*, January 29, 2001. Plant Pathology Station, INRA, France.
3. Quadt-Hallmann, A. and J.W. Kloepper. 1996. *Immunological detection localization of cotton endophytic Enterobacter asburiae JM 22 in different plant species*. *Can. J. Microbiol.* 42: 1144-1154.
4. Rolfe, B.G. and J.J. Weinman, 2001. *Rice cultivars and endophytic bacteria towards the developments of more effective nitrogen fixing associations*. RIRDC Publication. Available at : <http://www.rirdc.gov.au>. (diakses tanggal 8-7-2002).
5. Stoltzfus, J.R., R.So., P.P. Malarvithi, J.K. Ladha and F.J. de Bruijn. 1997. *Isolation of endophytic bacteria from rice and assesment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen*. *Plant and soil*. 194: 25-36
6. Setiawati, M.R., D.W. Santosa, T. Simarmata, Y. Sumarni, and D.H. Arief. 2003. *Peranan bakteri endofitik pemfiksasi N dalam meningkatkan fiksasi N₂ dan serapan N tanaman padi gogo*. Pros. Kongres HITI 2003, Padang.
7. Struz, A.V. and J. Nowak. 2000. *Endophytic communities of rhizobacteria and strategis required to create yield enhancing associations with crops*. *Applied Soil Ecology* 15: 183-190.